Kor. J. Food Hygiene 8(4), 195-204(1993)

신장근위곡세뇨관 막소포를 이용한 신장독성 실험모델 개발

3. Cephaloridine이 토끼 신장근위곡세뇨관의 물질이동에 미치는 영향

이영재 · 이창업 · 이문한 · 성하정 · 류판동
서울대학교 수의과대학

Development of a Novel Experimental Model for Nephrotoxicity Assessment Using Membrane Vesicles of Rabbit Renal Proximal Tubules

III. Effects of Cephaloridine on Uptakes of Some Substances across Membrane Vesicles of Rabbit Renal Proximal Tubles

Young-Jae Lee, Chang-Eop Lee, Mun-Han Lee, Ha-Jung Sung, Pan-Dong Ryu
College of Veterinary Medicine, Seoul National University

ABSTRACT – **Basolateral and brush border membrane (BLM and BBM) vesicles of renal proximal tubules were prepared from adult male New Zealand White rabbits to evaluate as a potential model for assessment of nephrotoxicity. PAH uptakes using BLMV, glucose and leucine uptakes using BBMV were measured in the rabbits treated cephaloridine. In addition, urinalysis and histopathological studies were performed to investigate the correlationship with membrane vesicle uptakes. The results were as follows: (1) The activity of Na^+, K^+-ATPase was enriched 12.3-fold in basolateral membrane vesicles (BLMV) and the specific activity of alkaline phosphatase in purified brush border membrane vesicles (BBMV) was enriched 10.1-fold compared with each of microsomal homogenate. (2) In the uptake experiments, cephaloridine decreased initial and probenecid-sensitive PAH uptakes in BLMV. (3) Cephaloridine tested decreased initial and phlorizin-sensitive glucose uptakes in BBMV. (4) Cephaloridine tested decreased initial and Na^+-dependent leucine uptakes in BBMV. (5) Cephaloridine tested significantly increased the urinary excretion of glucose and activity of γ-GTP. (6) Cephaloridine tested caused moderate necrotic changes in renal tubular cells and formation of urinary cast in the lumina of Henle's loop and collecting tubules besides the swelling of renal tubules.**

Keywords □ **Cephaloridine nephrotoxicity, basolateral membrane, brush border membrane, PAH, glucose, leucine**

신장은 대부분의 약물이나 독성물질의 주된 배설경로이기 때문에 다른조직에 비해 배설되는 화학물질에 의하여 손상을 입기 쉽다. 즉, 수은,[1] 납,[2] cadmium,[3] chromium,[4] bithmus[5]와 항암화학요법제인 cisplatin[6] 등의 중금속은 신장과 매우 친화성이 크며, 항생물질 중 amlinoglycoside계[7,8]와 cephalosporine계,[9] chloroform 등의 halogenated hydrocarbon[10] 그리고 ochratoxin A[11] 등의 곰팡이독소와 oxalate, tannin 등의 식물성분,[12] aspirin, phenacetin 등의 의약품[13,14] 등 다양한 종류의 물질이 신장 근위곡세뇨관의 변성 및 괴사를 일으키는 것으로 보고되어 있다. 따라서 이들 물질이 생체에 노출되었을 때 근위곡세뇨관에서 이루어지는 포도당, 아미노산 등의 영양물질, 유기음이온이나 유기양이온의 재흡수 및 분비기전에 영향을 미칠 것으로 예견된다.

지금까지 신장기능을 측정하는 방법으로는 각종

Received for publication December 15, 1993
Reprint request: M.-H. Lee at the above address

물질의 청소율시험 (clearance test), 요분석, 오줌 및 혈액의 효소활성치 측정 그리고 병리조직학적 방법이 사용되고 있다.[15-17] 그러나 이러한 방법으로는 정확한 중독기전을 구명하기에 미흡하고, 약·독물에 따라서는 투여용량과 투여기간에 따라 그 결과가 다르게 나타날 수도 있다.[19]

또한 현재 신장을 통한 물질의 재흡수 또는 배설기전을 연구하는데 이용되고 있는 신피질절편법 (renal cortex slice), 미세천자법 (micropuncture technique) 및 세포 배양법의 경우에도 쇄모연 특이효소 (brush border enzyme)와 glucogenetic activity의 소실, nephron의 극히 일부분에 국한된 결과, 물질에 따른 확산거리의 차이, 균질한 세포층 획득의 어려움, 포도당 등 이동되는 물질 자체의 대사의 문제점으로 정확한 독성기전을 구명하기에 어려운 점이 많다.[19]

최근에는 신장 근위곡세뇨관의 쇄모연 (brush border membrane, BBM)과 기저측막 (basolateral membrane, BLM)의 vesicle 제조방법이 확립됨으로써 이들 막을 통한 물질의 이동기전은 물론 세포이하의 수준에서 신장독성을 연구하는데 크게 기여하고 있다.[20-22] 즉 과거의 기법을 통하여 물질이동을 조사하였을 때, 쇄모연과 기저측막 중 어느 곳을 통하여 이동되는지 혹은 운반단백계의 소재가 어디인지 알 수가 없었으나 이 기법의 개발에 따라, para-aminohippurate (PAH)을 비롯한 유기음이온[23]은 기저측막을 통하여, tetraethylammonium (TEA) 등의 유기양이온,[24] 포도당[25] 그리고 아미노산[26]은 쇄모연을 통하여 재흡수 또는 분비됨이 밝혀졌다.

Cephaloridine은 반합성 cephalosporin계 항생물질의 하나로 그람양성균 및 그람음성균에 대해 모두 살균효과를 발휘하며 다른 cephalosporin계 항생물질에 비하여 신장독성이 큰 것으로 알려져 있다.[9] Cephaloridine은 토끼에서 신장근위곡세뇨관 및 Henle 계제의 광범위한 괴사를 일으키며, 당뇨, 단백뇨 등의 증상을 일으키는 것으로 알려져 있으나[27] 자세한 신장독성기전은 알려져 있지 않다.

저자 등은[21,22] 이미 신장근위세뇨관 vesicle을 사용하여 신장독성이 있는 것으로 알려져 있는 gentamicin과 uranyl acetate가 BBM과 BLM vesicle을 통한 물질이동에 미치는 영향을 조사하여 보고한 바 있다.

따라서 본 실험에서는 이러한 vesicle 조제기법을 사용하여 cephaloridine이 유기음이온, 아미노산 및 포도당의 막이동에 미치는 영향 즉 cephaloridine이 어떠한 기전에 의하여 신장독성을 유발하는지를 조사하고 이들 결과와 오줌 중의 신장유래 특이효소의 활성과 병리조직학적 변화와의 결과를 비교함으로써 renal membrane vesicle uptake 실험의 독성실험 모델로서의 효용성을 입증하고자 하였다.

재료 및 방법

생약제

실험동물은 체중 2~3 kg의 성숙한 New Zealand White 수토끼 32마리를 사용하였다. 약물투여군 및 무처치 대조군에 각 16마리씩 배치하고 각 12마리는 vesicle uptake 실시험에, 각 4마리는 병리조직학적 검사에 사용하였다. 사료(토끼용 펠렛사료, 신촌사료)와 물은 자유로이 급식시키면서 실험전 1주일간 실험실 환경에 적응시켰다.

약물투여

실험군은 cephaloridine (Sigma, 100 mg/kg body wt/day)을 7일간 피하로 주사하였다. 마지막 투여 24시간 후에 토끼를 희생시켜 다음과 같은 방법으로 막소포를 만들어 물질이동을 측정하였다.

신장 근위곡세뇨관 막소포를 이용한 물질이동 측정

막소포의 제조－신장근위곡세뇨관의 쇄모연(brush border membrane, BBM)과 기저측막(basolateral membrane, BLM)의 소포는 분별원심분리법[28]과 Percoll 미도경사 원심분리법[29]을 병용하여 제조하였다.

표지효소 활성도 측정－BLM의 표지효소인 Na^+, K^+-ATPase의 활성도는 Jørgenson과 Skou의 방법[30]에 따라 측정하였고, Na^+, K^+-ATPase의 활성도는 μmole Pi/mg protein/hr로 나타내었다.

Alkaline phosphatase의 활성도는 Wako사(Japan)의 serum alkaline phosphatase kit를 사용하여 측정하였으며 그 활성도는 King Armstrolng unit(KA unit)로 나타내었다.

단백질 농도는 bovine serum albumin을 표준시약으로 하여 Bradford의 방법[31]에 준하여 측정

하였다.

물질이동 측정－BLMV에 대하여는 유기음이온(para-amlinohippurate, PAH)의 uptake을 BBMV에 대하여는 leucine 및 포도당의 uptake을 실시하였다. 모든 uptake 실험은 rapid filtration method[32]에 준하여 실시하였다.

임상화학 및 병리조직학적 검사

임상화학적 검사－토끼를 대사 cage에 넣어 사육하면서 약물투여 개시전 및 투여기간 동안 매일 오전 8시에 24시간 오줌을 채취하여 요량, 요삼투압, 요단백, 요당, creatinine 및 urea nitrogen치를 측정하였으며, 신장독성의 지표로 사용되는 γ-glutamyl transpeptidase(γ-GTP)와 leucine aminopeptidase (LAP)의 활성도를 측정하였다.[33]

병리조직학적 검사－최종 약물 투여 후 24시간이 경과한 다음 투여군의 실험동물을 희생시켜 신장에서의 병리조직학적 변화를 광학현미경으로 관찰하였다.

결 과

신장근위곡세뇨관 막소포의 물질이동에 미치는 영향

표지효소 활성도－막소포가 순수하게 분리되었는지 확인하기 위하여 BLM과 BBM 각각의 표지 효소인 Na^+, K^+-ATPase와 alkaline phosphatase의 활성을 측정하였다. Na^+, K^+-ATPase의 활성은 BLMV에서 118.9 μmole Pi/protein/hr, BBMV에서 14.03 μmole/Pi/protein/hr로 microsomal homogenate의 9.64 μmole Pi/protein/hr에 비하여 각각 12.3배 및 1.46배이었다. Alkaline phosphatase의 활성은 BLMV에서 162.6 KA units, BBMV에서 395.0 KA unit로, microsomal homogenate의 39.1 KA units에 비하여 각각 4.16배, 10.1배이었다.

막소포를 통한 물질이동

PAH uptake－대조군 및 cephaloridine 투여군에서 BLMV의 PAH uptake치를 Na^+ 및 α-ketoglutarate 농도 경사하에서 incubation time에 따라 측정한 결과는 Fig. 1에서와 같다. 대조군에서 PAH uptake치는 60초에서 137.8 pmole PAH/mg protein/hr이었고, 60분 후에 측정된 값은 105.4 pmole PAH/mg protein/hr로 60초에서의 PAH uptake치가 평형상태 (60분)에서의 uptake치의 1.3배이었다. 2 mM probenecid에 의하여 PAH uptake가 억제되었는데, 대조군에서 Probenecid 감수성 PAH uptake치는 60초 및 60분에서 각각 59.1, 13.0 pmole PAH/mg protein/hr이었다.

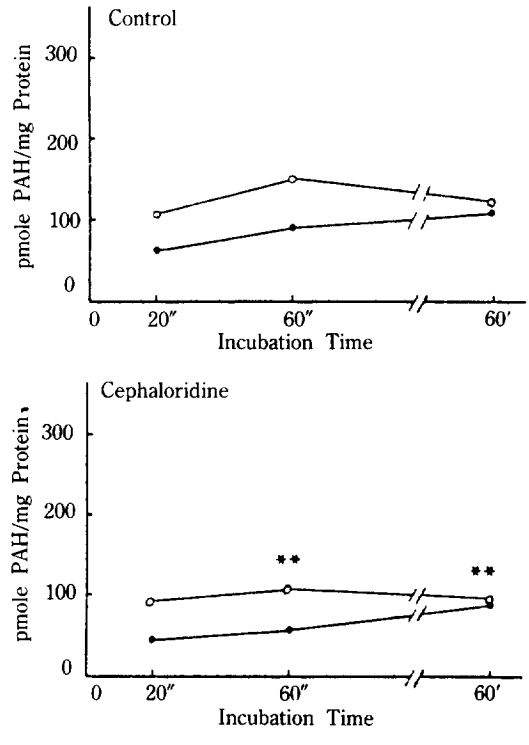

Fig. 1. The time course of PAH uptake in renal cortical BLMV of control and cephaloridine-treated rabbits. Membranes were preincubated for 30 min. at 37°C in vesicle buffer containing 100 mM NaCl, 20 mM HEPES (pH 7.4) and 1 mM α-ketoglutarate, then vesicular uptake of PAH was assayed at 25°C in the medium containing 100 mM NaCl, 100 mM mannitol, 20 mM HEPES (pH 7.4), 40 μM PAH, 3.6 μCi ^{3}H-PAH/ml of medium and either with (-●-) or without (-○-) 2 mM probenecid.
**: $p<0.01$.

Cephaloridine 투여군에서 60초에서의 총 PAH uptake치는 대조군에 비하여 75.0%로 감소하였고 ($p<0.01$), 60초에서의 Probenecid 감수성 PAH uptake치는 대조군에 비하여 75.2%로 감소되었다($p<$

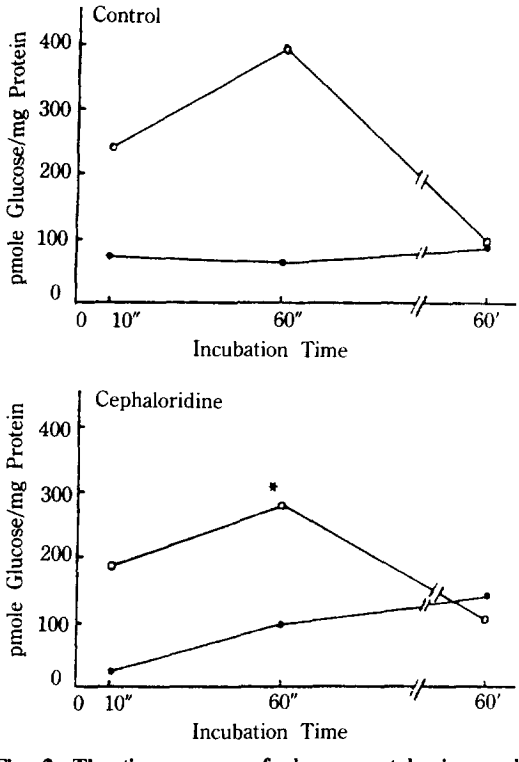

Fig. 2. The time course of glucose uptake in renal cortical BBMV of control and cephaloridine-treated rabbits. Membranes were preincubated for 30 min. at 37°C in vesicle buffer containing 100 mM NaCl and 20 mM HEPES (pH 7.4). Intravesicular content of glucose was assayed at 25°C in the medium containing 100 mM NaCl, 100 mM mannitol, 20 mM HEPES (pH 7.4), 100 μM glucose, 3.6 μCi ^{3}H-glucose/ml of medium and either with (-●-) or without (-○-) 1 mM phlorizin.
*: $p<0.05$.

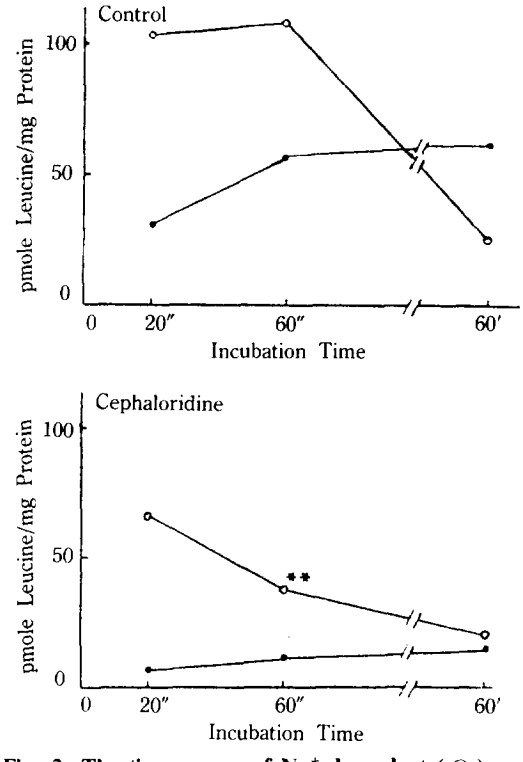

Fig. 3. The time course of Na^+-dependent (-○-) and Na^+-independent ((-●-) leucine uptake in renal cortical BBMV of control and cephaloridine-treated rabbits. Membranes were preincubated for 30 min. at 37°C in vesicle buffer containing 100 mM NaCl and 20 mM HEPES (pH 7.4). Intravesicular content of leucine was then assayed at 25°C in the medium containing 100 mM NaCl (or KCl in the case of Na^+-independent uptake), 100 mM mannitol, 20 mM HEPES (pH 7.4), 20 mM HEPES (pH 7.4), 20 μM leucine, 3.2 μCi ^{3}H-leucine/ml of medium.
**: $p<0.01$.

0.05).

포도당 uptake－대조군 및 cephaloridine 투여군에서 BBMV의 경시별 포도당 uptake치를 측정한 결과는 Fig. 2에서와 같다. 대조군에서 포도당 uptake치는 60초에서 389.5 pmole glucose/mg protein/hr이었고, 60분에서 9.56 pmole glucose/mg protein/hr로 60초에서의 포도당 uptake치가 평형상태 (60분)에서의 포도당 uptake치의 약 4.1배로 전형적인 "overshoot" 현상을 나타내었다. 대조군에서 phlorizin 감수성 포도당 uptake치는 대조군의 경우 60초 및 60분에서 각각 324.5, 9.0 pmole glucose/mg protein/hr이었다.

Cephaloridine 투여군에서 60초의 총 포도당 uptake치는 대조군의 71.2%로 감소되었고($p<0.05$), 60초에서의 phlorizin 감수성 포도당 uptake치가 대조군의 15.4%로 현저히 감소되었다($p<0.05$).

Leucine uptake－대조군 및 cephaloridine 투여군에서 BBMV에서의 경시별 leucine uptake치를 측정한 결과는 Fig. 3에서와 같다. 대조군에서 총 leucine uptake치는 60초에서 110.0 pmole leucine

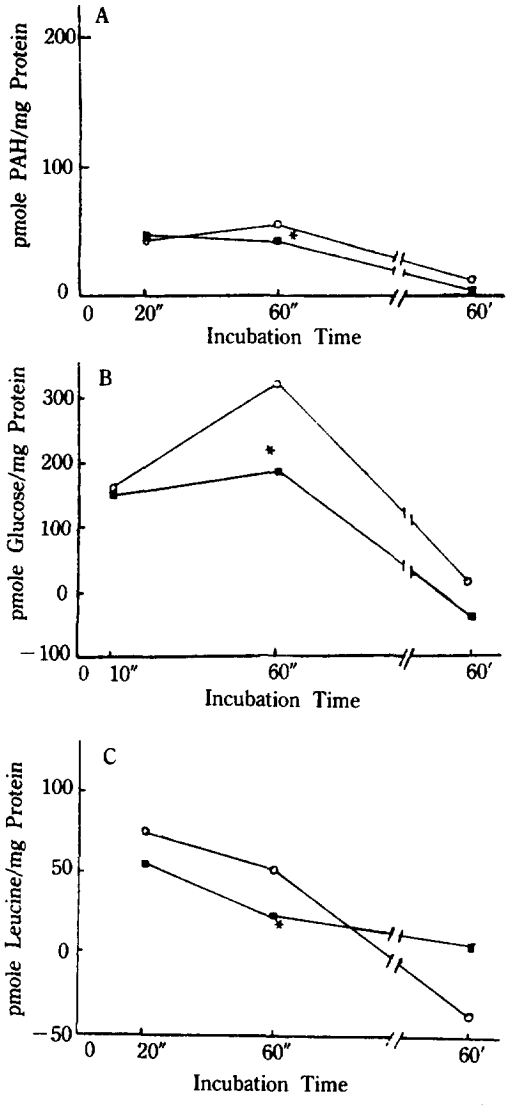

Fig. 4. Effects of cephaloridine on the probenecid-sensitive PAH (A), phlorizin-sensitive glucose (B) and Na^+-dependent lecine (C) uptakes. Values are based on the data shown in Fig. 1, 2, 3.
○: control. ■: cephaloridine.
*: $p<0.05$.

/mg protein/hr이었고, 60분에서는 34.3 pmole leucine/mg protein/hr로서 Na^+ 의존성 전형적인 "overshoot" 현상이 관찰되었다. 이때 대조군의 경우 Na^+-dependent leucine uptake치는 60초에서 52.4 pmole leucine/mg protein/hr이었다.

Cephaloridine 투여군에서 60초에서 총 leucine

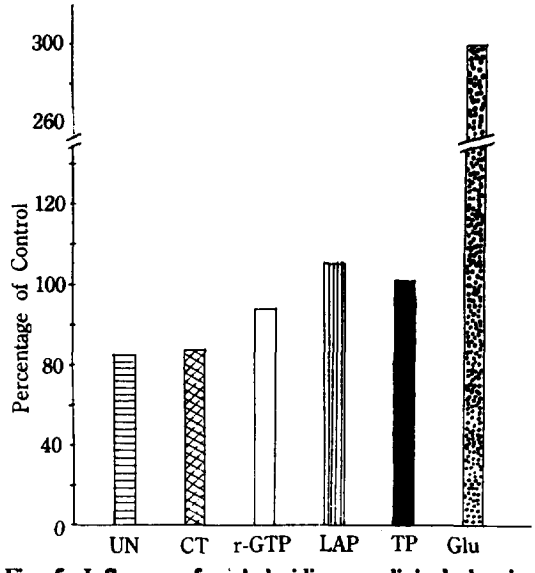

Fig. 5. Influence of cephaloridine on clinical chemistry parameters. UN; urinary urea nitrogen, CT; urinary creatinine, γ-GTP; gamma-glutamyl transpeptidase, LAP; leucine aminopeptidase, TP; urinary total proteins, Glu; urinary glucose. Urine was collected during 24 hr after treatment of cephaloridine (100 mg/kg body wt/day, s.c.) for 7 days. Values are expressed as percentage of control.
*: $p<0.05$.

uptake치는 대조군의 34.8%로 감소되었고($p<0.01$), Na^+-dependent leucine uptake치도 cephaloridine 투여군에서 유의성 있게 감소하였다($p<0.05$).

임상화학 및 병리조직학적 소견

임상화학적 소견－Cephaloridine의 투여전 및 투여기간 동안 24시간 간격으로 오줌을 채취하여 요량, 요당, creatinine 및 urea nitrogen치와 γ-GTP, LAP의 활성을 측정하였다(Fig. 5). 요량은 실험기간동안 변화가 매우 심하였으며, 요삼투압은 유의한 변화가 없었다. 최종 약물 투여 후 24시간 동안 오줌을 채취하여 임상화학적 소견을 관찰한 결과, γ-GTP의 활성 및 포도당 배설량만이 유의성 있게 증가하였다($p<0.05$).

병리조직학적 소견－약물투여가 끝난 24시간 후에 cephaloridine 투여군의 실험동물을 희생시켜 신장을 적출하여 병리조직학적 소견을 광학현미경으로 관찰한 결과 근위곡세뇨관 상피세포의 세포종

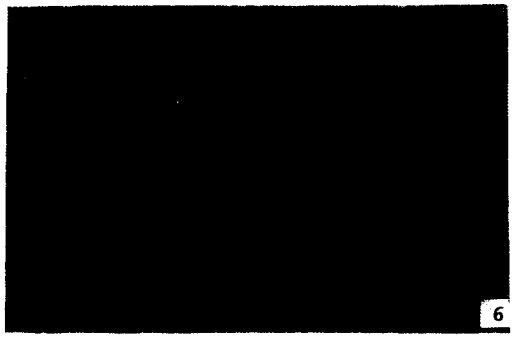

Fig. 6. Cellular swelling and necrotic changes in the proximal and distal convoluted tubules following 7 days of cephaloridine treatment (100 mg/kg body wt/day, s.c.). H & E staining. X 200.

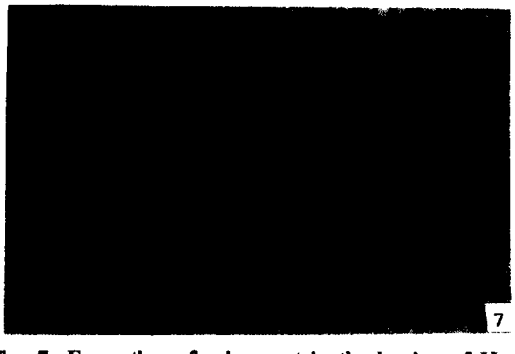

Fig. 7. Formation of urine cast in the lumina of Henle's loop and collecting tubules following 7 days of cephaloridine treatment (100 mg/kg body wt/day, s.c). H & E staining. X 400.

창, 원위곡세뇨관 상피세포의 괴사, 탈락 및 붕괴 그리고 Henle 계제와 집합세관의 확장 및 요원주 형성이 관찰되었다(Fig. 6, 7).

고 찰

지금까지 연구된 각종 신장독성물질의 경우, 대부분이 근위곡세뇨관의 퇴행성 변화와 괴사를 일으키는 것으로 알려져 있다. 따라서 신장독성물질에 의하여 신세뇨관이 형태학적 변화를 보이기 이전에 세포의 구성 성분 혹은 생리적 기능물질이 먼저 화학적 손상을 받을 것이며, 약 또는 독물에 따라서 신세뇨관의 BLM 및 BBM에 존재하는 유기음이온, 포도당 및 아미노산 운반계의 기능이 억제될 것으로 사료된다. 최근에는 신세뇨관의 막소포 제조방법이 확립되어 이들 물질의 막을 통한 이동 기전은 물론 세포 이하의 수준에서 조직병변을 연구하는데 크게 기여하고 있다. 즉 BLM 및 BBM vesicle을 이용한 막이동 기전 연구는 막소포 제조에 다소 시간이 걸리며, 서로 다른 세포의 오염 가능성을 배제할 수 없는 단점이 있으나, 막소포내에서는 대사과정이 일어나지 않으므로 특이적인 막이동 기전을 연구할 수 있고, 막소포 내외의 물질조성을 쉽게 조절할 수 있어 물질이동의 원동력 (driving force)을 구명하는데 매우 유용하며, BLM과 BBM을 분리하여 실험할 수 있으므로 각각의 물질이동 특성을 연구할 수 있는 장점이 있다.[34] 그러므로 세뇨관의 BLM 및 BBM 각각의 막소포를 이용한 신장독성 평가의 유용성을 입증하고자 신장독성이 있는 것으로 알려져 있는 gentamicin[21]과 uranyl acetate[22]를 투여한 토끼에서 물질이동의 측정을 조사 보고한 바 있다.

본 연구에서 BLM 및 BBM 막소포의 분리제조는 Percoll 밀도경사 원심분리법 및 2가 양이온 (Ca^{2+}) 침전법을 이용하였다. 즉 분리한 BLM과 BBM은 초고속원심 분리하여 Percoll을 제거하였고, BBM 층에서는 양이온인 Ca^{2+}을 가하여 더욱 정제하여 막소포를 제조하였다. 본 실험에서 BLMV 및 BBMV의 특이효소인 Na^+, K^+-ATPase와 alkaline phosphatase의 활성을 기준으로 하였을 때 microsomal homogenate에 비하여 각각 12.3배, 10.1배의 높은 활성을 나타내었다. Microsomal homogenate에 대한 BLM의 Na^+, K^+-ATPase와 alkaline phosphatase의 각각 활성은 Scalera 등[35]과 Inui 등[36]의 Percoll 밀도경사법에 의한 BLM 및 BBM 정제법에서는 각각 3.5배와 5.9배, 3.1배와 7,4배이었으며, Kinsella 등[28]과 Mollitoris와 Simon[37] sucrose gradient/divalent cation precipitation을 이용한 방법에서는 각각 24배와 19.1배, 7.2배와 13.7배이었고, Mollitoris와 Simon[37]의 free flow electrophoresis를 이용한 방법에서는 각각 7.2배와 13.7배로서, 본 연구에서 비교적 잘 정제된 BLM 및 BBM 막소포를 제조하였음을 알 수 있었다.

PAH는 유기음이온의 prototype으로서 신세뇨관을 통하여 효율적으로 분비되는 반면 체내 효소에 의하여 파괴되지 않고 또 재흡수되는 양이 적기 때문에 유기음이온 이동 연구에 널리 이용되어

왔다.[38]

PAH는 신장근위세뇨관에서의 능동수송에 의하여 분비된다.[39] 즉, PAH는 일단 BLM을 통하여 상피세포 내로 이동하고,[40] 이어 촉진적 확산에 의하여 BBM을 통해 요중으로 배설된다.[23] BLM에서의 PAH 이동기전에는 여러가지 가설이 있으나 최근에 이르러 acid/acid exchange system인 것으로 정립되고 있으며, vesicle을 이용한 연구결과에 의하면 OH^-, Cl^-, sulfate 등의 무기음이온이나 oxoglutarate와 같은 유기음이온이 PAH와 상호교환되는 것으로 알려져 있다.[41] 본 연구에서는 예비실험을 통하여 vesicle내에 1 mM의 α-ketoglutarate를 첨가하였을 때 PAH의 uptake가 증가됨을 관찰하였으며, 초기 (60초)의 uptake치가 평형상태 (60분)의 uptake치보다 약 1.3배로 "overshoot" 현상이 관찰되었으며, 이것은 2 mM probenecid에 의하여 억제됨으로써 BLM vesicle에서의 PAH uptake가 carrier-mediated system에 의해여 이루어짐을 확인하였다.

포도당은 BBM에 존재하는 Na^+-solute cotransport system에 의하여 세뇨강액으로부터 신세뇨관 상피세포내로 능동적으로 운반된다. 이 결과 신세뇨관 상피세포내의 포도당 농도는 증가하게 되고 이에 따라 촉진적 확산에 의하여 BLM을 통하여 혈액내로 운반됨으로써 재흡수된다.[42] BBM vesicle을 이용한 연구에서 포도당 uptake은 Na^+ 경사에 의하여 현저히 증가되며, energy를 필요로 하는 능동적 과정이라는 것과 phlorizin에 의하여 억제된다는 사실이 증명되었다.[43] 그리고 경시별로 포도당 uptake 측정시 rat,[20] 토끼[44] 및 사람[45] 등에서 초기에 급격히 uptake가 증가하는 "overshoot" 현상이 나타났으며, phlorizin에 의하면 이런 "overshoot" 현상이 완전히 소실된다고 하였다.[45] 본 연구에서는 예비실험을 통하여 vesicle buffer에서 Na^+을 K^+으로 대치시켰을 때, 또는 phlorizin을 incubation buffer에 첨가함에 의하여 BBM vesicle에서의 포도당 uptake이 현저히 감소됨을 관찰하였다. 즉 Na^+ 의존성 및 phlorizin 감수성 포도당 uptake을 관찰하여 전자들의 보고와 일치된 결과를 얻었다. 그리고 경시별uptake을 실시한 결과 60초에서의 uptake가 평형상태 (60분)에서보다 약 4.1배 증가하여 Na^+ 의존성 포도당 uptake의 전형적인 "overshoot" 현상을 나타내었다.

이 연구에서 cephaloridine을 투여한 실험군에서 총포도당 uptake치와 Na^+ 혹은 probenecid 의존성 포도당 uptake치 그리고 총 leucine utake치와 Na^+ 의존성 leucine uptake치가 모두 감소하여 BBM에서의 포도당 및 아미노산 이동에 영향을 줌을 알 수 있었다.

아미노산 BBM에 존재하는 운반단백질에 의하여 신세뇨관 상피내로 Na^+함께 능동적으로 이동하는 것으로 알려져 있으며,[46] 아미노산의 group에 따라서 각기 다른 특성의 운반체가 존재하는 것으로 알려져 있다.[47] 본 연구에서는 대조군 BBMV의 60초에서 leucine uptake치가 평형상태의 약 3.2배로 "overshoot" 현상을 나타냈으며, Na^+을 K^+으로 대치시 이런 현상이 억제되어 전자들의 보고와 일치하는 결과를 얻었다.

Cephaloridine은 실험동물에서 사구체 여과율의 감소, 당뇨, 단백뇨 등을 유발하며,[48] 근위세뇨관 세포의 괴사를 일으키고, 유기음이온 운반계에 의하여 근위세뇨관 상피내로 이동하나, 유기음이온과는 다르게 아주 소량만이 BLM을 통하여 오줌 중으로 배설되므로, 높은 농도로 세뇨관 상피세포에 축적이 되며 이로 인하여 신장독성을 유발하는 것으로 알려져 있다.[40]

반면 McMurtry와 Mitchell[49]은 cytochrom P-450 억제제로 cobalt chloride와 piperonyl butoxide를 전처치 함으로써 cephaloridine의 신장독성을 완화시킬 수 있음을 보고하였다. 즉, cephaloridine의 신장독성 유발에는 대사적 활성화 과정이 필수적임을 제시하였다. 그러나 동물체내에 투여된 cephaloridine의 약 90%가 대사되지 않은 상태로 오줌 중에서 검출되었으며,[50] HPLC 분석시에도 신장 피질에서 그 대사물질을 검출할 수 없었다.[51] 또한 Tune[40]에 의하면 cobalt chloride를 60 mg/kg의 용량으로 2일간 토기에 전처치시 cephaloridine의 신장독성을 막지 못했으며, piperonyl butoxide 전처치시 신피질의 cephaloridine 농도가 현저히 감소하는 동시에 신장독성을 완화시킬 수 있었다. 이는 piperonyl butoxide의 신장독성 억제효과가 대사억제에 기인한다기 보다는 신피질 부위에서의 운반기능에 의한 것으로 생각된다. 그러나 생체조직의 거대분자와 cephaloridine의 공유결합에 의해 그 생리적 기능에 변화를 주어 신장독성이 일어날 가능성도 배제할 수

없다.

본 연구에서는 오줌 중 γ-GTP의 활성증가, 당뇨, 단백뇨, BUN 및 혈청의 creatinine의 증가 및 신세뇨관의 괴사 등이 관찰되었는데, 이는 vesicle uptake 실험에서 PAH 포도당 및 leucine uptake가 모두 현저히 감소되는 것과 매우 큰 상관성을 보이고 있다. 따라서 막소포를 이용한 vesicle uptake 실험법이 cephaloridine의 신장독성평가 기법으로 활용가능하리라 생각된다.

이상의 연구와 같이 신장독성을 평가하는데 기존의 병리조직학적 방법과 임상병리학적 방법에 renal membrane vesicle을 이용한 vesicle uptake system이 보완되면 보다 정확하고 신속하게 신장독성을 구명할 수 있을 것이며, 특히 vesicle uptake system은 BLM과 BBM을 각각 분리하여 실험함으로써 신장독성물질의 작용부위 및 작용기전을 연구하는데 매우 유용하리라 사료된다.

국문요약

Cephaloridine을 성숙한 New Zealand White 수토끼에 투여한 후, 신장의 피질부를 절제하여 기저측막소포 (basolateral membrane vesicles, BLMV)와 솔모연소포 (brush border membrane vesicle, BBMV)를 제조하였다. 제조한 소포를 이용하여 유기음이온의 일종인 *p*-aminohippurate (PAH), 아미노산의 일종인 leucine 및 포도당의 막이동을 측정하고, 이와 병행하여 오줌 중에서의 신장유래 특이효소 활성도 측정, 임상화학 및 병리조직학적 검사를 수행하여 무투약 대조군에서 보인 결과와 비교함으로써 다음과 같은 결과를 얻었다. (1) BLM의 표지효소인 Na^+, K^+-ATPase의 활성도는 BLMV에서 microsomal homogenate에 비하여 12.3배의 BBM의 표지효소인 alkaline phosphatase의 활성도는 BBMV에서 microsomal homogenate에 비하여 10.1배의 높은 활성을 나타내어 본 실험에서 제조한 vesicle system의 순수도가 높음이 증명되었다. (2) BLMV에서의 PAH uptake는 무투약 대조군에 비하여 cephaloridine에 의하여 absolute 및 probenecid-sensitive uptake가 억제되었다. (3) cephaloridine에 의하여 BBMV에서의 포도당 uptake은 absolute 및 phlorizin-sensitive uptake 무투약 대조군에 비하여 현저히 억제되었다. (4) cephaloridine에 의하여, BBMV에서의 leucine uptake은 absolute 및 Na^+-dependent uptake가 무투약 대조군에 비하여 현저히 억제되었다. (5) 임상화학적 분석결과, cephaloridine에 의하여 오줌 중의 γ-GTP의 활성 및 포도당 배설량만이 유의성 있게 증가하였다($P<0.05$). (6) 병리조직학적 검사에서는 투여된 cephaloridine에 의하여 근위곡세뇨관 상피세포의 세포종창, 원위곡세뇨관 상피세포의 괴사, 탈락 및 붕괴와 Henle계제 및 집합세관의 확장 및 요원주 형성이 관찰되었다.

참고문헌

1. Chang, L.W., Ware, R.A., Desnoyer, P.A.: A histochemical study on some enzyme changes in the kidney, liver and brain after chronic mercury intoxication in the rat. *Food. Cosmer. Toxicol.*, **11**, 283-286 (1973).
2. Hirsch, G.H.: Effect of chronic lead treatment on renal function. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **25**, 89-93 (1973).
3. Goyer, R.A., Miller, C.R., Zhu, S.Y., Victery, W.: Non-metallothionein-bound cadmium in the pathogenesis of cadmium nephrotoxicity in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **101**, 232-244 (1989).
4. Biber, T.U.L., Mylle, M., Baines, A.D., Gottschalk, C.W., Oliver, J., Macdowell, M.C.: A study by micropuncture and microdissection of acute renal damage in rats. *Am. J. Med.*, **44**, 664-705 (1968).
5. Glassock, R.J., Cohen, A.H., Adler, S.G., Ward, H. J.: Secondary glomerular diseases. *In The Kidney*. (Brenner, B.M. and Rector, F.C. eds.) Sounders, Philadelphia, 1014-1084 (1986).
6. Fillastre, O.P., Raguenez-Viotte, G.: Cisplatin nephrotoxicity. *Toxicology Letters*, **46**, 163-175 (1985).
7. Tulkens, P.M.: Nephrotoxicity of aminoglycoside antibiotics. *Toxicology Letters*, **46**, 107-123 (1989).
8. Falco, F.G., Smith, H.M. Arcieri, G.M.: Nephrotoxicity of aminoglycoside and gentamicin. *J. Infect. Dis.*, **119**, 406-409 (1969).
9. Silverblatt, F., Harrison, W.O. and Turck, M.: Nephrotoxicity of cephlosporin antibiotics in experimental lanimals. *J. Infect. Dis.*, **122**, 33-44 (1973).
10. Kluwe, M.M.: The nephrotoxicity of low molecular weight halohenated alkane solvents, pesticide

and chemical intermediates. *In Toxicology of Kidney* (Hook, J.B. ed.) Raven Press, p. 179-226 (1981).

11. Albassam, M.A., Young, S.I., Bhatnagar, R., Sharma, A.K., Prior, N.G.: Histopathologic and electronmicroscopic studies on the acute toxicity of ochratoxin a in rats. *Vet. Pathol.*, **24**, 427-435 (1987).
12 Osweiler, G.D., Carson, T.L., Burk, W.B., Gelder, G.A.V.: Mycotoxicosis, *In Clinical and Diagnostic Veterinary Toxicology*, p. 409-482 (1985).
13. Porter, G.A., Bennett, W.M.: Nephrotoxic acute renal failure due to common drugs. *Am. J. Physiol.*, **241**, F1-F8 (1981).
14. Newton, J.F., Yoshimoto, M., Bernstein, J., Rush, G.F., Hook, J.B.: Acetaminophen nephrotoxicity in the rat. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **69**, 291-306 (1983).
15. Offerman, J.J., Meijer, S., Sleijfer, D.T. and Pipers, D.A.: ^{131}I-hipurrate clearance in the detection of cisplatin nephrotoxicity. *Nuklearmedizin*, **25**, 39-40 (1986).
16. Goren, M.P., Wright, r.K., Horowitz, M.E. and Meyer, W.H.: Enhancement of methotrexate nephrotoxicity after cisplatin therapy. *Cancer*, **58**, 2617-2621 (1986).
17. Kelen, D.P., Alcock, N. and Young, C.W.: Cisplatin nephrotoxicity: Correlation with plasma platinum concentration. *Am. J. Clin. Oncol.*, **8**, 77-80 (1985).
18. Pariat, C., Courtois, P., Cambar, J., Piriou, A. and Bouquet, S.: Circardian variations in the renal toxicity of gentamicin in rats. *Toxicology Letters*, **40**, 175-182 (1988).
19. Tyson, C.A., Dabbs, J.E., Cohen, P.M., Green, C.E., Melnick, R.L.: Studies of nephrotoxic agents in an improved renal proximal tubule system. *Toxicol om votro*, **4**, 403-408 (1990).
20. Kinne, R., Murer, H., Kinne-Saffran, E., Thees, M. and Sachs, G.: Sugar transport by renal plasma membrane vesicles: Charterization of the systems in the brush border microvilli and basolateral plasma membranes. *J. Membr. Biol.*, **21**, 375-395 (1975).
21. 이영재, 이창업, 이문한, 류판동, 성하정, 박종명, 조준형, 남궁선: 신장근위곡세뇨관 소포를 이용한 신장독성 실험모델 개발: 1. Gentamicin이 토끼 신장근위곡세뇨관 소포에서의 물질이동에 미치는 영향. 서울대 수의대논문집, **17**, 51-63 (1992).
22. 이영재, 이창업, 이문한, 류판동, 성하정, 박종명, 이재진, 박근식: 신장근위곡세뇨관 소포를 이용한 신장독성 실험모델 개발: 2. Uranyl acetate가 토끼 신장근위곡세뇨관 소포에서의 물질이동에 미치는 영향. 독성학회지, **8**, 95-107 (1992).
23. Kinsella, J.L., Holoha, P.D., Pessah, N.I. and Ross, C.R.: Transport of organic ions in renal cortical luminal and antiluminal membrane vesicles. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **209**, 443-450 (1979).
24. Holohan, P.D. and Ross, C.R.: Mechanisms of organic cation transport in kidney plasma membrane vesicles: 1. countertransport studies. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, **245**, 1191-197 (1980).
25. Ella, N., Sljack, C.-C., Liang, T. and Sacktor, B.: Transport of L-proline and D-glucose in luminal (brush border) and contraluminal(basal-lateral) membrane vesicles from the renal cortex. *Biochem Biophys Res. Commu.*, **77**, 891-897 (1977).
26. Ulrich, K.H., Hans, R.P., Christian, J. and Sheikh, M.I.: Renal transport of neutral amino acids: Tubular localization of Na^+-dependent phenylalanin and glucose-transport systems. *Biochem J.*, **220**, 15-24 (1984)
27. Atkinson, R.M., Caisey, J.P., Currie, J.P., Middleton, T.R., Pratt, D.A.H., sharpe, H.M. and Tomich, E.G.: Acute toxicity of cephaloridine, an antibiotic derived form cephalosporin C. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **8**, 398-406 (1966).
28. Kinsella, J.L., Holohan, P.D., Pessah, N.I. and Ross, C.R.: Isolation of luminal and antiluminal membranes from dog kidney cortex. *Biochim Biophys Acta*, **552**, 468-447 (1979).
29. Scalera, V., Storelli, C., Storelli-Joss, J., Hlasse, W. and Murer, H.: A simple and fast method for the isolation of basolateral plasma membranes from rat small intestinal epithelial cells. *Biochem J.*, **186**, 177-181 (1980).
30. Jφgenson, P.L. and Skou, J.: Purification and characterization of (Na^+-K^+)-ATPase. I. The influence of detergents on the activity of (Na^+-K^+)-ATPase in preparations from the outer medulla of rabbit kidney. *Biochim Biophys Acta*, **233**, 366-380 (1971).
31. Bradford, M.M.: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analt Biochem.*, **72**, 248-254 (1976).
32. Berner, W. and Kinne, R.: Transport of *p*-aminohippurate by plasma membrane vesicles isolated from rat kidney cortex. *Pflugers Arch.*, **361**, 269-

277 (1976).
33. Endou, H.: Use of isolated segments for the evaluation of nephrotoxicity. In: Safety Assessment of Chemicals *in vitro* Proceedings of the 1st Korean-Japan Toxicology Symposium, 57 (1987).
34. Ross, C.R. and Holohan, P.D.: Transport of organic anions and cations in isolated renal plasma membranes. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, **23**, 65-85 (1983).
35. Scalera, V., Huang, Y.K., Hildemann, B. and Murer, A.: A simple isolation method for basal-lateral plasma membranes from rat kidney cortex. *Membr. Biochem.*, **4**, 49-61 (1981).
36. Inui, K.I., Tomonobu, O., Takano, M., Kitazawa, S. and Hori, R.: A simple method for the isolation of basolateral plasma membrane vesicles from rat kidney cortex. *Biochim. Biophys. Acta*, **647**, 150-147 (1981).
37. Mollitoris, B.A. and Simon, F.R.: Renal cortical brush-border and basolatral membranes: Cholesterol and phospholipid composition and relative turnover. *J. Memb. Biol.*, **83**, 207-215 (1985).
38. Mϕller, J.V. and Sheikn, M.I.: Renal organic anion Renal organic anion system: Pharmacological, physiological, and biochemical aspects. *Pharmacol. Rev.*, **34**, 315-356 (1983).
39. Cortney, M.A., Mylle, M., Lassier, W.E. and Gottschalk, C.W.: Renal tubular transport of water, solute and PAH in rats loaded with isotonic saline. *Am. J. Physiol.*, **209**, 1199-1205 (1965).
40. Tune, B.M.: Realtionship between the transport and toxicity of cephalosporines in the kidney. *J. Infect. Dis.*, **132**, 189-194 (1975).
41. Low, I., friedrich, T. and burckhardt, G.: Properties of an anion exchanger in rat renal basolateral membrane vesicles. *Am. J. Physiol.*, **246**, F334-F 342 (1984).
42. Turner, R.J. and Moran, A.: Heterogeneity of sodium-dependent D-glucose transport site along the proximal tuble: Evidence from vesicle studies. *Am. J. Physiol.*, **242**, F406-F414 (1982).
43. Aronson, P.S. and Sacktor, B.: The sodium electrochemical potential-mediated uphill transport of D-glucose in renal brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.*, **250**, 6032-6039 (1975).
44. Beck, J.C. and Sacktor, B.: The sodium electrochemical potential-mediated uphill transport of D-glucose in renal brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.*, **253**, 5531-5535 (1978).
45. Turner, R.J. and Silverman, M.: Sugar uptake into brush border vesicles from normal human kidneys. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **74**, 2825-2829 (1977).
46. Fass, S.J., Hammerman, M.R. and Sactor, B.: Transport of amino acids in renal brush border membrane vesicles. *J. Biol. Chem.*, **252**, 583-590 (1977).
47. Silbernagl, S.: Amlino acids and oligopeptides. *In The Kidney* (Seldin, D.W., Giebisch, G. eds.) Raven Press, New York, p. 1677-1701 (1985).
48. Goldstein, R.S., Smith, P.F., Tarloff, J.B., Contardi, L., Rush, G.F. and Hook, J.B.: Biochemical mechanism of cephaloridine nephrotoxicity. *Life Sciences*, **42**, 1809-1816 (1988).
49. McMurtry, R.J. and Mitchell, J.R.: Renal and hepatic necrosis after metabolic activation of 2-substituted furans and thiophenes including furosemide and cephaoridine. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **42**, 285-300 (1977).
50. Welles, J.S., Gibson, W.R., Harris, P.N., Small, R. M., and Anderson, R.C.: Toxcity, distribution and excretion of cephaloridine in laboratory animals. *In Antimicrob. agents chemother.* (Hobby, G.L. ed.) American Society for Microbiology, Ann Arbor, Michigan, p. 863 (1965).
51. Wold, J.S. and Turnipseed, S.A.: Determination of cephaloridine in serum and tissue by high-performance liquid chromatography. *J. Chromatogr.*, **136**, 170-173 (1977).